

METHODE ZUR KOMBINIERTEN ENZYMZYTOCHEMISCHEN UND AUTORADIOGRAFISCHEN
PHANOTYPISIERUNG DERMALER INFILTRATE

Dr.rer.nat. Karl Albert

Duss München
1983



Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München
Direktor: Prof.Dr.Dr.h.c. O. Braun-Falco

METHODE ZUR KOMBINIERTEN ENZYMZYTOCHEMISCHEN UND AUTORADIOGRAFISCHEN
PHÄNOTYPISIERUNG DERMALER INFILTRATE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dr.rer.nat. Karl Albert

aus

München

Jahr

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. G. Burg

Mitberichterstatter: Professor Dr.Dr.h.c. O. Braun-Falco

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 1983

I N H A L T

	Seite
1. EINLEITUNG	5
2. MATERIAL UND METHODEN	8
2.1 Untersuchungsmaterial	8
2.2 Enzymnachweis in Semidünn- und Paraffin-	
schnitten	9
2.2.1 Anfertigung von Gewebescheiben	9
2.2.2 Inkubationskammer	9
2.2.3 En bloc-Inkubation	11
2.2.4 Optimierungsbereich der Inkubation	13
2.2.5 Fixierung	14
2.2.6 Einbetten, Schneiden	15
2.3 In vitro Autoradiografie	16
2.3.1 Einbau radioaktiver Substanzen	16
2.3.2 Nachweis radioaktiv markierter Zellen	17
2.3.3 Einfluß der Enzymfarbstoffe auf die strah-	
lenempfindliche Emulsion	18
3. ERGEBNISSE	20
3.1 Nachweis der sauren Phosphatase	20
3.2 Andere Enzyme	20
3.3 Enzymnachweis und Autoradiografie	22

	Seite
4. DISKUSSION	25
4.1 Möglichkeiten der Zelldifferenzierung	25
4.2 Enzymdarstellung in Semidünn- und Paraffin- schnitten mit Hilfe der en bloc-Inkubation	26
4.3 Kombiniertes Verfahren: Enzymzytochemie mit Autoradiografie	29
4.4 Lymphomatoide Papulose	30
5. ZUSAMMENFASSUNG	34
6. LITERATURVERZEICHNIS	35

1. EINLEITUNG

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Methoden zur Ergänzung der klassischen feingeweblichen Untersuchung entwickelt und eingesetzt. Heute verfügen wir über mehrere Methoden, die über die Morphologie des Gewebes hinaus eine spezifische Zelldifferenzierung ermöglichen. Hierzu gehören die Elektronenmikroskopie, die Histochemie, die Immunhistochemie und -zytologie, die Autoradiografie und andere Methoden. Die Histochemie liefert zusätzliche Informationen über biochemische Funktionen einzelner Gewebsstrukturen. Um die biochemische Aktivität der lysosomalen Enzyme nicht zu beeinträchtigen, werden die meisten histochemischen Untersuchungen an Kryostatschnitten durchgeführt. Die Kryostatschnitte werden auf dem Objektträger verschiedenen Substraten ausgesetzt und das durch die enzymatische Spaltung erhaltene Reaktionsprodukt durch ein Kopplungssalz gefärbt. Der Nachteil dieser Methode besteht in der schlechten morphologischen Qualität besonders der zytologischen Strukturen. Sie ist weitaus geringer als bei Paraffin- oder Semidünnschnitten.

Zu den Ausnahmen gehört das Enzym Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase. Die am Zellausstrich und am Gefrierschnitt bekannte Nachweisreaktion für dieses Enzym kann auch am Paraffinschnitt durchgeführt werden (31). An pflanzlichen Geweben (24) und an menschlichen Lymphozytensubpopulationen (11) gelang der Nachweis nach Einbettung in Methacrylat. Die lysosomale saure Phosphatase konnte für die Zwecke der Elektronenmikroskopie mit Hilfe der Bleiphosphattechnik von mehreren Autoren reproduzierbar nachgewiesen werden (19).



Von einigen Gruppen wird über die Möglichkeit des histochemischen Enzymnachweises beim Einbetten in Methacrylat bei tiefen Temperaturen berichtet. Unterschiedlich wurde diese Technik an Mäusepräparaten (26), an pflanzlichen Präparaten (3), an BCG geimpften Ratten (25) und an Knochenmarksschnitten (45) angewandt. Die hierbei durchgeführte Polymerisation des Methacrylates bei 4 °C schont die Enzymaktivität und erlaubt bei einer entsprechend längeren Inkubation der Schnitte noch deren Nachweis.

Ziel dieser Arbeit ist es, bei exzellenter Strukturierung des Gewebeschnittes, wie sie durch die Paraffin- oder Methacrylateinbettung zu erreichen ist, zusätzlich präzise Auskünfte über die Lokalisation lysosomaler Enzyme in der Zelle zu erhalten. Diese Symbiose - bestmögliche Strukturierung mit Bestimmung des Enzymprofils einer Zelle im umliegenden Gewebe - würde auch funktionelle Aspekte der jeweiligen Zelle verdeutlichen und eine weitere Differenzierung und somit eine genauere Diagnosestellung ermöglichen. Auf dem Gebiet der kutanen Lymphome möchten wir dazu beitragen, histozytäre Zellen gegen lymphoide Blasten abzugrenzen. Aus unserer Sicht ergeben sich die besten Ergebnisse bei Anwendung einer neuen "en bloc"-Enzymeinfärbung mit nachfolgender Fixierung und Einbettung. Hierzu haben wir das in Kapitel 2.2 näher beschriebene Verfahren entwickelt und benutzt.

Ein weiteres Ziel unserer Arbeit bestand darin, diese neue histochemische Technik mit der von Kummermehr (29) entwickelten Autoradiografie an Hautexzisionen zu kombinieren. Wir könnten dann die Morphologie, das Enzymmuster der Zelle und ihre Kinetik, gemessen z.B. am

Thymidineinbau, am selben Schnitt simultan untersuchen. Als Anwendungsbeispiel möchten wir das Krankheitsbild der lymphomatoiden Papulose herausstellen.

Tabelle 1		1952
1. Gruppe	10	10
2. Gruppe	10	10
3. Gruppe	10	10
4. Gruppe	10	10
5. Gruppe	10	10
6. Gruppe	10	10
7. Gruppe	10	10
8. Gruppe	10	10
9. Gruppe	10	10
10. Gruppe	10	10
11. Gruppe	10	10
12. Gruppe	10	10
13. Gruppe	10	10
14. Gruppe	10	10
15. Gruppe	10	10
16. Gruppe	10	10
17. Gruppe	10	10
18. Gruppe	10	10
19. Gruppe	10	10
20. Gruppe	10	10
21. Gruppe	10	10
22. Gruppe	10	10
23. Gruppe	10	10
24. Gruppe	10	10
25. Gruppe	10	10
26. Gruppe	10	10
27. Gruppe	10	10
28. Gruppe	10	10
29. Gruppe	10	10
30. Gruppe	10	10
31. Gruppe	10	10
32. Gruppe	10	10
33. Gruppe	10	10
34. Gruppe	10	10
35. Gruppe	10	10
36. Gruppe	10	10
37. Gruppe	10	10
38. Gruppe	10	10
39. Gruppe	10	10
40. Gruppe	10	10
41. Gruppe	10	10
42. Gruppe	10	10
43. Gruppe	10	10
44. Gruppe	10	10
45. Gruppe	10	10
46. Gruppe	10	10
47. Gruppe	10	10
48. Gruppe	10	10
49. Gruppe	10	10
50. Gruppe	10	10
51. Gruppe	10	10
52. Gruppe	10	10
53. Gruppe	10	10
54. Gruppe	10	10
55. Gruppe	10	10
56. Gruppe	10	10
57. Gruppe	10	10
58. Gruppe	10	10
59. Gruppe	10	10
60. Gruppe	10	10
61. Gruppe	10	10
62. Gruppe	10	10
63. Gruppe	10	10
64. Gruppe	10	10
65. Gruppe	10	10
66. Gruppe	10	10
67. Gruppe	10	10
68. Gruppe	10	10
69. Gruppe	10	10
70. Gruppe	10	10
71. Gruppe	10	10
72. Gruppe	10	10
73. Gruppe	10	10
74. Gruppe	10	10
75. Gruppe	10	10
76. Gruppe	10	10
77. Gruppe	10	10
78. Gruppe	10	10
79. Gruppe	10	10
80. Gruppe	10	10
81. Gruppe	10	10
82. Gruppe	10	10
83. Gruppe	10	10
84. Gruppe	10	10
85. Gruppe	10	10
86. Gruppe	10	10
87. Gruppe	10	10
88. Gruppe	10	10
89. Gruppe	10	10
90. Gruppe	10	10
91. Gruppe	10	10
92. Gruppe	10	10
93. Gruppe	10	10
94. Gruppe	10	10
95. Gruppe	10	10
96. Gruppe	10	10
97. Gruppe	10	10
98. Gruppe	10	10
99. Gruppe	10	10
100. Gruppe	10	10

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsmaterial

Hautbiopsien von 20 Patienten (9 Frauen, 11 Männer, Alter zwischen 26 und 78 Jahren) wurden untersucht. Dabei handelte es sich um fünf Patienten mit lymphomatoider Papulose, vier mit Mycosis fungoides, drei Patienten mit einem B-Zell-Lymphom, zwei Patienten mit einem B-Zell-Pseudo-Lymphom, einer mit Lymphadenitis cutis benigna; zwei waren an Morbus Hodgkin erkrankt und jeweils ein Patient mit Ekzem, Rosacea und Basaliom kamen hinzu (Tab. 1).

Die Aufbereitung der Biopsien für den Semidünnschnitt bzw. den Paraffinschnitt und die in vitro Autoradiografie mit Tritiumthymidin erfolgte in der unten beschriebenen Weise.

Alter	Geschlecht	D i a g n o s e
64	m	Ekzem
33	m	Rosacea
57	m	Basaliom
43	m	Morbus Hodgkin
48	w	"
35	m	Pseudolymphom
45	m	"
53	w	"
26	m	Lymphomatoide Papulose
44	m	"
47	m	"
74	m	"
78	m	"
53	m	zentroblastisch-zentrozytisches Lymphom
76	w	"
78	w	"
38	w	Mycosis fungoides
63	w	"
69	w	"
78	w	"

Tab. 1 Haut-
biopsien von
20 Patienten

2.2 Enzymnachweis in Semidünnschnitten

2.2.1 Anfertigung von Gewebescheiben

Eine Probeexzision der Haut wird unmittelbar nach der Entnahme mit Hilfe eines speziellen Messers (Abb. 1) in mehrere dünne Scheiben geschnitten. Dieses besteht aus sieben Rasierklingen und sechs Distanzplatten und zwei Führungsplatten. Als Distanzplatten benutzen wir jeweils zwei Deckgläser

Objektträger für Lichtmikroskopie. Den Zusammenhalt des Messers besorgt ein Cyanoacrylat-Schnellkleber. Das Messer ist durch die großflächige Klebung biegestabil, und auch die einzelnen Klingen halten den vorgegebenen Abstand von $400\ \mu$ beim Schneiden der Exzision ein.

Die so erhaltenen Hautscheiben stellen einen Querschnitt der Haut von der Epidermis bis zum subkutanen Fettgewebe dar und sind über die gesamte Fläche gleichmäßig dick. Es empfiehlt sich, für jede neue Hautexzision mit einem unbenutzten Teil des Messers zu schneiden. Als Schneideunterlage eignet sich besonders eine Platte aus Kork, da sie ein Rutschen des Exzidates verhindert und beim notwendigen Durchschneiden der Haut das Messer schont.

2.2.2 Inkubationskammer

Die Methode der histochemischen Färbung en bloc erfolgt an den Gewebescheiben. Hierzu benutzen wir eine Inkubationskammer (Abb. 2), die aus zwei Teilen besteht. Der untere Teil, die eigentliche Kammer, ist mit einem Einlaß- und einem Auslaßhahn versehen. Seitlich sind vier Zugschrauben angebracht. Der obere Teil, der Deckel der Kammer,

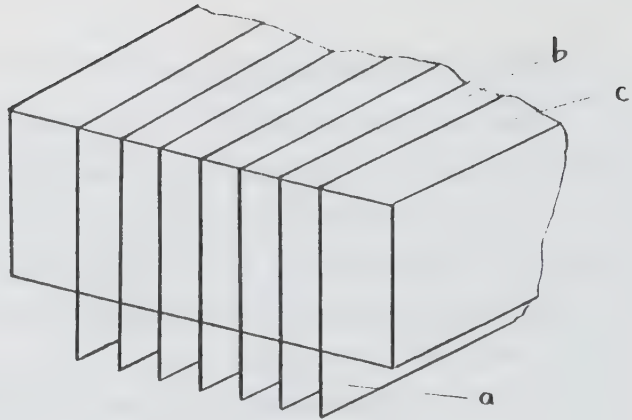


Abb. 1 Mehrfachmesser, bestehend aus sieben Rasierklingen (a), sechs Distanzplatten (b) und zwei Führungsplatten (c) an den Seiten

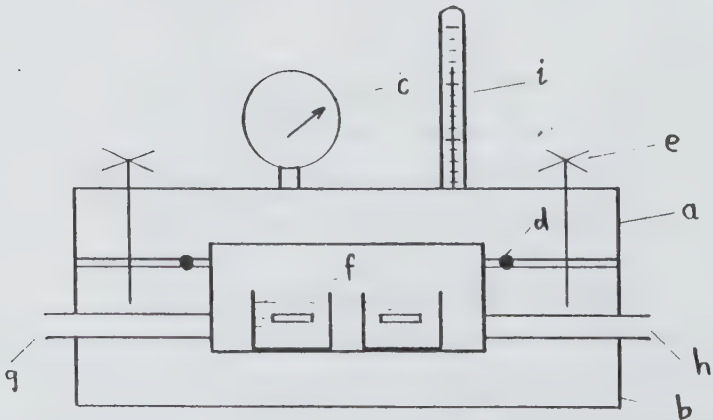


Abb. 2 Inkubationskammer: (a) Deckel, (b) eigentliche Kammer, (c) Manometer, (d) Dichtring, (e) Zugschraube mit Flügelmutter, (f) Inkubationslösung mit Gewebescheiben, (g) Einlauf, (h) Auslauf (i) Thermometer

trägt ein Mannometer und ein Thermometer. Vier Bohrungen ermöglichen das Zusammenziehen des oberen und des unteren Kammerteils mit Flügelmuttern. Zwischen beiden Teilen liegt ein Polyuretanring, der die Abdichtung besorgt. Die Kammer ist aus durchsichtigem Plexiglas angefertigt und kann mit einem Gasüberdruck bis 5 atm gefüllt werden. Gleichzeitig kann sie im Wasserbad auf einer gewünschten Temperatur gehalten werden.

2.2.3 Inkubation

In die Inkubationskammer werden mehrere Gefäße eingeführt, die mit Gewebescheiben und verschiedenen Inkubationsmedien gefüllt sind. Als Inkubationsmedien für den Nachweis lysosomaler Enzyme der Zelle benutzen wir die gleichen Lösungen, die bei der Anfärbung von Kryostat-schnitten benutzt werden.

Die luftdicht verschlossene und mit Gewebescheiben in Inkubationslösung beschickte Kammer wird mehrfach mit der gewählten Gasart geflutet und ein vorgegebener Überdruck eingestellt. Danach wird sie mit Hilfe einer Schnellkupplung von der Gasleitung getrennt und in ein Wasserbad getaucht. Die Temperatur wird so gewählt, daß ein Optimum der Enzymreaktion erreicht ist.

Für die Enzymdarstellung werden die bei der Färbung von Kryostat-schnitten üblichen Lösungen benutzt. Für den Nachweis saurer Phosphatase eignet sich die simultane Azokupplung mit Phosphateestern (39):

Teil A 6 Tropfen Pararosanilinlösung (s.u.) werden mit

6 Tropfen 4 % wässriger Natriumnitritlösung vermischt,
nach 60s mit

30 ml 0,1 M Michaelispuffer pH 7,62 verdünnt.

und mit

einigen Tropfen 2 n HCl auf pH 5,0 eingestellt

(Pararosanilinlösung: 1 g Pararosanilin Hydrochlorid in

10 ml H₂O lösen und

5 ml konzentrierte HCl hinzugeben.

Danach erwärmen, abkühlen und filtrieren.

Bei 4 °C eine Woche haltbar.)

Teil B 10 mg Naphtol-AS-Biphosphat werden in

1 ml Dimethylformamid gelöst

Inkubationslösung: Teil A und B zusammen gießen und filtrieren.

Die Lösung ist bei 4 °C eine Woche haltbar.

Inkubationszeit: 24 + 12 h bei 37 °C und 3 atm Sauerstoffüberdruck.

Nachweis der β-Glucuronidase (22)

Substratlösung: 28 mg Naphthol-AS-BI-β-D Glucuronid

werden in

1,2 ml 0,05 M NaHCO₃ (420 mg/100 ml H₂O)

gelöst und auf

100 ml mit 0,2 N Acetatpuffer pH 5,0

aufgefüllt. Bei Zimmertemperatur ist diese

Lösung 2 bis 3 Wochen haltbar.

Inkubationslösung: 5 Tropfen Pararosanilinlösung (s.o.)

5 Tropfen 4 % wässriger Natriumnitritlösung und

10 ml Substratlösung vermischen, mit

1 N NaOH auf pH 5,2 bringen und auf

20 ml mit H₂O auffüllen und filtrieren.

Die Lösung ist bei 4 °C 2 Tage haltbar.

Inkubationszeit: 36 $\pm$ 12 h bei 37 °C und 3 atm Stickstoffüberdruck.

Nachweis alkalischer Phosphatase mit simultaner Azokupplung (14):

Inkubationslösung: 1 ml Naphthol AS-MX Phosphat (Sigma),

0,1 ml N,N-Dimethylformamid und

4,9 ml TRIS 0,1 M pH 8,2 mit

6 mg Fast Blue BB Salt (Sigma) mischen.

Inkubationszeit: 4 $\pm$ 2 h bei 22 °C und 3 atm Sauerstoffüberdruck.

2.2.4 Optimierungsbereich der Inkubation

Die optimalen Werte für die Wahl des Gases, des Überdrucks, der Temperatur und der Zeit haben wir für folgende Bereiche bestimmt. Bei der Flutung der Kammer haben wir Stickstoff, Luft und Sauerstoff gewählt. Zum Nachweis der sauren Phosphatase und der alkalischen Phosphatase hat sich der Sauerstoff am besten bewährt, und bis zu einem Überdruck von 3 $\pm$ 1 atm konnten die Ergebnisse erheblich verbessert werden. Die β -Glucuronidase konnte dagegen unter Stickstoffüberdruck am besten nachgewiesen werden. Es scheint, daß Sauerstoff die Nachweisreaktion in diesem Falle behindert. Die Höhe des Stickstoffüberdruckes ist nicht wesentlich.

Die Inkubationstemperatur haben wir von 22 - 50 °C variiert und für die meisten Enzymreaktionen (saure Phosphatase, β -Glucuronidase, saure Esterase) bei 37 $\pm$ 5 °C den günstigsten Bereich gefunden. Lediglich die Darstellung der alkalischen Phosphatase zeigt bessere Ergebnisse, wenn die Inkubation bei Zimmertemperatur abläuft.

Die Inkubationszeit hat sich zum Nachweis saurer Phosphatase bzw.

β -Glucuronidase oberhalb von 12 h bzw. 20 h als relativ unempfindlich erwiesen, so daß eine Inkubation über Nacht möglich ist. Für die alkalische Phosphatase und auch die saure Esterase ist eine längere Inkubationszeit als 6 h von Nachteil.

Abschließend kann man für alle Enzymnachweisreaktionen sagen, daß eine niedrige Inkubationstemperatur (unterhalb 37 °C) durch eine längere Inkubation ersetzt werden kann. Die angegebenen optimalen Bereiche für Temperatur und Zeit haben jedoch insofern ihre Bedeutung, als längere Inkubationszeiten zur Diffusion des Reaktionsproduktes und zum Zusammenfließen gefärbter Strukturen führen.

2.2.5 Fixierung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Inkubationskammer aus dem Wasserband herausgenommen, der Oberdruck abgelassen, die Kammer geöffnet und die Gefäße mit Lösungen und Hautscheiben herausgenommen. Die Hautscheiben werden in der Fixierlösung mehrfach gespült. Die Fixierlösung kann folgendermaßen zubereitet werden:

4 g NaH_2PO_4 + 2 H₂O und
6,5 g Na_2HPO_4 (wasserfrei) in
800 ml aqua dest. auflösen und
200 ml 37 % Formaldehyd und
570 ml 99 % Alkohol hinzugeben.

Diese Lösung erleichtert die spätere Einbettung in Methacrylat und verhindert ein Herauswaschen der en bloc Anfärbung.

Die eigentliche Fixierung erfolgt in zwei Stufen.

Da die Scheiben nach der Inkubation unterschiedlich zusammengezogen

und gewellt sind, ist zuerst eine Vorfixierung in planer Form notwendig. Dies geschieht in einer Art Sandwichtechnik. Auf ein planes und mit vielen feinen Perforationen versehenes Edelstahlplättchen wird feines Filterpapier gelegt und darauf die inkubierte Hautscheibe. Wieder Filterpapier und ein Edelstahlplättchen vervollständigen das Sandwich, das für mindestens 2 h in die Fixierlösung getaucht wird. Nach dieser Vorfixierung ist die Hautscheibe plan und behält diese Form auch während der nachfolgenden Fixierung: freischwebend in der Lösung für weitere 24 h.

2.2.6 Einbetten, Schneiden

Das Einbetten erfolgt wahlweise in Paraffin oder Methacrylat. Auch hier ist es erforderlich, darauf zu achten, daß die Scheiben im planen Zustand eingebettet werden. Sonst erhält man beim Schneiden nur kleine tangentiale Anschnitte. Die üblichen Schneideverfahren für Paraffin- resp. Semidünnschnitt-Technik für Acrylat werden angewandt.

2.2.7 Gegenfärbung

Die auf einem Objektträger vorliegenden Schnitte zeigen jetzt schon spezifische Einfärbung, die untersucht werden kann. Zur Verdeutlichung der Zellmorphologie benutzen wir eine Gegenfärbung.

Als Kontrast können bei rötlichen Enzymreaktionen (wie Pararosanilin für saure Phosphatase, saure Esterase und β -Glucuronidase) Methylblau, Hämallaun oder Harris' Hämatoxylinlösung (Papanicolaous Lösung 1a) angewandt werden. Bei bläulichen Enzymreaktionen (wie Echtblausalz für alkalische Phosphase) eignet sich Erythrosin oder Kernechtrot. Die Paraffinschnitte werden vor der Gegenfärbung entparaffiniert,

die Semidünnschnitte können entacryliert werden. Die gegengefärbten Schnitte werden mit einem Deckglas versehen.

2.3 In vitro Autoradiografie

Das in den vorigen Abschnitten beschriebene Verfahren der en bloc Anfärbung kann mit der Autoradiografie kombiniert werden. Hierzu sind zwei Schritte notwendig: Der Einbau radioaktiver Substanzen in das zu untersuchende Gewebe und der Nachweis dieser Radioaktivität.

2.3.1 Einbau radioaktiver Substanzen

Dieser Schritt kann nur an lebenden bzw. stoffwechselaktiven Zellen durchgeführt werden. Im zeitlichen Ablauf muß er deshalb noch vor der histochemischen Färbung und unmittelbar nach dem Schneiden der Hautbiopsie in dünne Scheiben erfolgen. Die Scheiben werden nach der von Kummermehr (29) benutzten Methode unmittelbar in ein Nährmedium (z.B. Eagle's Lösung) übertragen.

Das Nährmedium enthält tritiummarkiertes Thymidin in einer Konzentration von 2 $\mu\text{Ci/ml}$ Lösung. Während der Inkubation wird das markierte Thymidin in aktive Zellkerne eingebaut. Um die Stoffwechselaktivität des Gewebes aufrecht erhalten zu können, wird dieser Einbau in der oben beschriebenen Kammer (Abb. 2) unter 2,5 atm Sauerstoffüberdruck und bei 37 °C vorgenommen. Der Einbau radioaktiven Thymidins erreicht nach 2 h eine Sättigung. Um einen stationären Zustand zu erhalten, darf diese Zeit bei der Inkubation nicht unterschritten werden. Eine längere Inkubation dagegen stört nicht. Nach Ablauf der Inkubationszeit kann die Kammer mit Luft geflutet und die Hautscheiben heraus-

genommen werden. Um das nicht eingebaute Thymidin zu entfernen, wird mehrfach in Hank's Lösung gespült. Die im Gewebe eingebaute Radioaktivität entzieht sich einer direkten Beobachtung. Sie kann jedoch indirekt einer lichtmikroskopischen Betrachtung zugeführt werden.

2.3.2 Nachweis radioaktiv markierter Zellen

Zum zeitlichen Ablauf soll folgendes angemerkt werden. Der Markierung der Zellen mit Radioaktivität wird die histochemische Inkubation en bloc angeschlossen. Nach der oben beschriebenen Fixierung werden die Scheiben eingebettet und geschnitten. Erst danach werden die radioaktiven Markierungen sichtbar gemacht.

Um das in Zellkerne eingebaute Tritiumthymidin nachweisen zu können, bedarf es eines strahlenempfindlichen Filmes in unmittelbarer Nachbarschaft des mikroskopischen Schnittes. Ein solcher Film entsteht durch Eintrocknen einer speziellen Emulsion. Diese ist handelsüblich und kann von folgenden Firmen bezogen werden: Eastman Kodak Co., Rochester, NY, als NTB Emulsion; Fa. Ilford, 6078 Neu Isenburg, als K2 Emulsion.

Die Objektträger mit gefärbten Schnitten werden in die lichtempfindliche Emulsion kurz eingetaucht und getrocknet. So entsteht eine strahlenempfindliche Schicht direkt auf dem Schnitt. Diejenigen Zellen, die das radioaktive Thymidin inkorporiert haben, schwärzen die darüber liegende Schicht. Die notwendige Expositionszeit beträgt 14 Tage. Alle Arbeiten mit der lichtempfindlichen Emulsion und den beschichteten Objektträgern müssen selbstverständlich in

absoluter Dunkelheit durchgeführt werden. Erst nach der in der Fotografie üblichen Entwicklung und Fixierung der lichtempfindlichen Schicht können die Objektträger aus der Dunkelkammer herausgenommen werden. Das inkorporierte Tritium ist jetzt durch Schwärzungspunkte lichtmikroskopisch sichtbar.

Die Gegenfärbung der Schnitte kann entweder vor der Beschichtung oder auch durch die Schicht erfolgen. Der Film wird dann mit einer Quelllösung vorbehandelt und für den Farbstoff durchgängig gemacht.

Quelllösung: 180 ml 80 % Alkohol mit
 20 ml 25 % Amoniak vermischen

Eintauchen der Objektträger für ca. 10 Minuten.

2.3.3. Einfluß der Enzymfarbstoffe auf die strahlenempfindliche Emulsion

Während der ersten Versuche, die Histochemie an Semidünnschnitten mit der Autoradiografie zu kombinieren, hat sich gezeigt, daß eine Reaktion zwischen dem Farbstoff des Schnittes und der lichtempfindlichen Emulsion stattfindet, und zwar wahrscheinlich nur während der Zeit, in der die Emulsion auf dem Schnitt trocknet. Diese Reaktion verursacht eine zusätzliche Schwärzung, die die eigentliche Markierung überdeckt. Um diesen unerwünschten, störenden Effekt zu vermeiden, trennen wir den Gewebeschnitt von der lichtempfindlichen Emulsion durch eine zusätzliche Schicht.

Zur Herstellung dieser Trennschicht haben wir folgende Lösung benutzt:

1 ml Deckglasersatzmittel (z.B. Fa. Merck) in
50 ml Xylol gelöst.

Der mit Gewebeschnitten beschickte Objektträger wird mit dieser Lösung benetzt und an der Luft getrocknet. So entsteht eine Trennschicht, die eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem Enzymnachweisfarbstoff und der später aufgetragenen strahlenempfindlichen Emulsion ausreichend behindert.

Hierbei ist darauf zu achten, daß die so entstehende Trennschicht nicht zu dick wird. Einerseits trennt eine dicke Schicht den Gewebeschnitt von der lichtempfindlichen Emulsion hervorragend, andererseits schwächt sie die radioaktive Strahlung durch Absorption und Auffächerung des Strahls. Die Schwärzung über den markierten Zellkernen wird verwaschener und weniger deutlich.

In unseren Versuchen war die Trennschicht dünner als $1\ \mu$ und erfüllte beide gegenläufige Kriterien gut. Zum Vergleich haben wir die Autoradiografie an ungefärbten Schnitten mit und ohne Trennschicht durchgeführt. Da ein Unterschied nicht feststellbar ist, können wir davon ausgehen, daß die Trennschicht die Strahlung der Tritiumkerne nicht merklich behindert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Nachweis der sauren Phosphatase

Mit Hilfe der en bloc Färbung konnten wir mehrere lysosomalen Enzyme in Semidünnschnitten und Paraffinschnitten darstellen. Die Vorteile dieses Verfahrens können am deutlichsten beim Nachweis der sauren Phosphatase dargelegt werden. In der Abb. 3 zeigen wir den Vergleich zwischen einem Kryostatschnitt, einem Paraffinschnitt und einem Semidünnschnitt. In allen dreien ist die saure Phosphatase dargestellt. Der Kryostatschnitt (Abb. 3a) ist auf herkömmliche Weise angefärbt, der Paraffin- und der Semidünnschnitt (Abb. 3b und 3c) sind mit Hilfe der en bloc Färbung entstanden.

Die sehr gute Zelldifferenzierung, insbesondere im Semidünnschnitt ist deutlich. Wie erwartet, ist unsere Methode mit der Semidünnschnitttechnik dem Kryostatverfahren in Bezug auf die Zellmorphologie überlegen.

Man kann große Blasten mit fleckförmiger saurer Phosphatase neben großblasigen Kernen erkennen. Starke Positivität zeigen auch Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten.

3.2 Andere Enzyme

Auch die β -Glucuronidase konnte mit unserer Enzymdarstellung in Semidünnschnitten nachgewiesen werden. Das Enzym ist sehr empfindlich, und es bedarf einer langen, mindestens 24-stündigen Inkubationszeit. Als günstig hat sich herausgestellt, das Inkubationsmedium während der Inkubation regelmäßig zu erneuern.

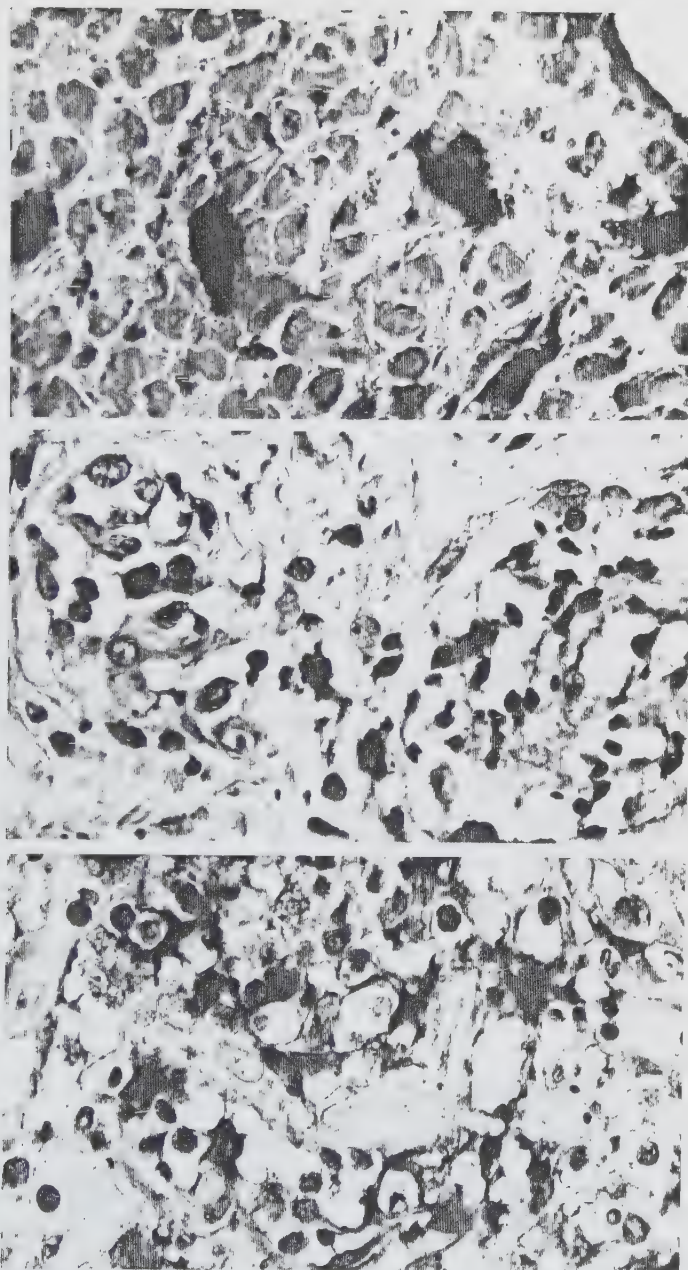


Abb. 3 Enzymzytochemische Darstellung von Makrophagen. Saure Phosphatase
 a) Kryostatschnitt
 b) Paraffinschnitt nach en bloc Inkubation
 c) Semidünnschnitt (Methacrylat) nach en bloc Inkubation
 Mikr.Vergr. 630 x

Die alkalische Phosphatase konnte bei Benutzung der simultanen Azokupplungsmethode nach Burstone (14) in Paraffin- und Semidünnschnitten nachgewiesen werden. Die Anfärbung ist typischerweise an Gefäßen sehr deutlich. Das klassische Metallsalzverfahren nach Gomori (21) konnte wegen der zwei hintereinander durchzuführenden Schritte nicht angewandt werden.

Die Darstellung der sauren Esterase ist ebenfalls möglich, bringt jedoch keine wesentlichen Vorteile gegenüber der üblichen Kryostat-technik. Die spezifische Anfärbung ist sehr intensiv und läßt wegen der Diffusion des Reaktionsproduktes eine klare Zuordnung zu bestimmten morphologischen Strukturen nicht zu.

Weitere Enzyme wie die ATP-ase, 5-Nucleotidase oder auch die Diaminpeptidase IV konnten mit den herkömmlichen Inkubationslösungen für Kryostatschnitte nicht in Semidünnschnitten dargestellt werden. Eines der Hauptprobleme liegt unserer Meinung nach darin, daß es sich nicht um ein einziges Inkubationsmedium handelt. Während das zweite Medium angewandt wird, diffundiert das erste Medium wegen der relativ langen Inkubationszeit von den spezifischen Orten in die Umgebung der Zellen. Die Anfärbung ist dann diffus und gibt das Enzymmuster der Zelle nicht wieder.

3.3 Enzymnachweis und Autoradiografie

Die Kombination beider Verfahren kann bei allen Enzymen angewandt werden, die auch für den en bloc-Nachweis und somit für die Semidünnschnitttechnik geeignet sind. Die Methodik dieses Kombinationsverfahrens ist in Kap. 2.3 beschrieben. Die Abb. 4 zeigt in einem

Semidünnschnitt den Nachweis der sauren Phosphatase. Zusätzlich sind auch die in Proliferation befindlichen Zellkerne autoradiografisch durch Gruppen von Schwärzungspunkten markiert. Der Untergrund ist nur schwach erkennbar. Auffallend in diesem Beispiel ist, daß die autoradiografisch markierten Zellen keine oder nur eine schwache Einfärbung mit saurer Phosphatase zeigen.

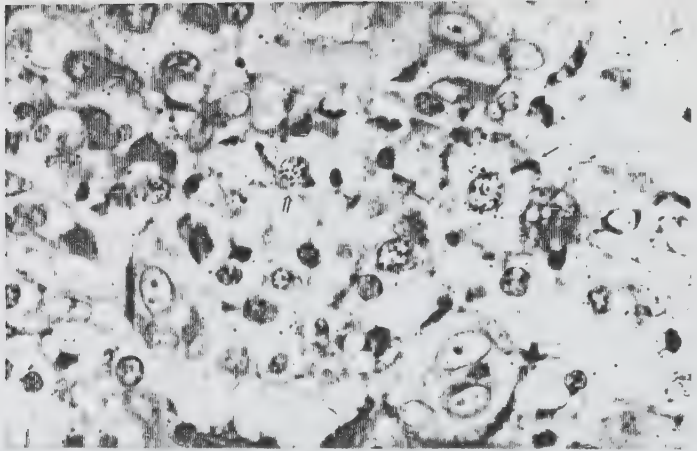


Abb. 4 Zentroblastisch-zentrozytisches Lymphom der Haut. Kombiniert enzymzytochemische (†) saure Phosphatase und autoradiografische (‡) Phänotypisierung proliferierender Zellen.
Mikr. Vergr. 630 x

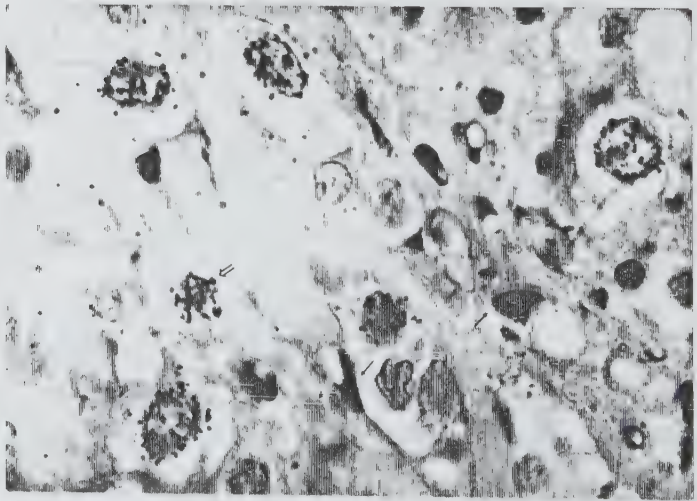


Abb. 5 Lymphomatoide Papulose. Kombiniert enzymzytochemische (†) saure Phosphatase und autoradiografische (‡) Phänotypisierung proliferierender Zellen.
Mikr. Vergr. 1000 x

4. DISKUSSION

4.1 Möglichkeiten der Zelldifferenzierung

Die verschiedenen Zellen einer Gewebsprobe können auf unterschiedlichste Weise differenziert werden.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen an Hämatoxilin-Eosin gefärbten Paraffinschnitten sind der Hauptbestandteil einer histologischen Untersuchung. Die zeitlich aufwendigere Semidünnschnitttechnik wird in den Fällen angewandt, in denen es wichtig erscheint, nur eine Zelllage lichtmikroskopisch zu untersuchen.

Die Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie sind durch ein sehr hohes Auflösungsvermögen gekennzeichnet und erlauben es, die Zellmorphologie bis in die einzelnen Organellen zu verfolgen. Sie haben jedoch den Nachteil, daß wegen der starken Vergrößerungen nur wenige Zellen im Verband im Blickfeld dargestellt sind.

Mit histochemischen Methoden kann eine Phänotypisierung der Zellen aufgrund ihres Enzymmusters vorgenommen werden.

Das zelleigene Enzym wandelt das angebotene Substrat direkt oder über eine weitere Reaktion in ein kontrastgebendes Produkt um. Eines der methodischen Probleme liegt dabei in der Erhaltung der Enzymaktivität. Die meisten histochemischen Untersuchungen lassen sich nur an Kryostatschnitten durchführen.

Aufgrund bestimmter Zelloberflächenrezeptoren kann eine Immunphänotypisierung von Infiltratzellen mit Hilfe der direkten oder indirekten Immunfluoreszenz oder immunenzymatischen Methoden vorgenommen werden, wobei die Spezifität derartiger Untersuchungstechniken durch den Einsatz monoklonaler Antikörper in den letzten Jahren erheblich ge-

steigert werden konnte.

Diese Methoden erlauben die Differenzierung der Zellen aufgrund zelltypischer oder zellspezifischer Merkmale. Die Zellkinetik und die Zellfunktion werden von einer weiteren Gruppe von Methoden dargestellt. Dazu gehört das Anfertigen von Histogrammen, das Abzählen von Mitosen und die in vivo bzw. in vitro Autoradiografie. Die eigentliche Zellteilung, die als Mitose einer direkten mikroskopischen Abzählung zugänglich ist, findet in der M-Phase des Zellzyklus statt. Die von uns angewandte in vitro Autoradiografie benutzt als Marker radioaktives Thymidin.

Thymidin kommt in der Zelle hauptsächlich als einer der vier Nukleoside der chromosomalen DNA vor. Die RNA enthält kein Thymidin, da es bei der Proteinbiosynthese als Uracil transskribiert wird. Nur bei der Replikation der DNA wird also Thymidin eingebaut (23).

Dieser Einbau findet nur in der S-Phase des Zellzyklus statt. Da die S-Phase wesentlich länger als die M-Phase eines Zellzyklus ist, kann die Thymidin Autoradiografie schon in frühen Stadien der Zyklusbeschleunigung Hinweise auf den Proliferationsgrad bzw. die Malignität eines Tumorgewebes liefern.

4.2 Enzymdarstellung in Semidünnschnitten und Paraffinschnitten mit Hilfe der en bloc-Inkubation

Der Paraffinschnitt ist das klassische Substrat der routinemäßigen Beurteilung der Gewebe- und Zellmorphologie. Ein Nachteil besteht darin, daß an Paraffin eingebetteten Material enzymzytochemische Untersuchungen - von wenigen Ausnahmen, wie z.B. Chloracetatfärbung,

abgesehen - zur Charakterisierung funktioneller Leistungen der Zelle nicht durchgeführt werden können.

Die Nachweismethode der Naphthol-AS-Chloracetat-Esterase wurde von Moloney (38) entwickelt und in der Hämatologie zur zytochemischen Darstellung der neutrophilen Reihe benutzt (20, 23). Weiter hat sich gezeigt, daß dieses sehr stabile Enzym auch in Paraffinschnitten nachweisbar ist (31). Das Spektrum der Einsetzbarkeit wurde vervollständigt, indem sich gezeigt hat, daß diese Reaktion auch an Kunststoff eingebetteten Knochenschnitten (13) und an Gewebeschnitten nach Methacrylat-Einbettung (24) durchführbar ist. Der Nachweis anderer lysosomaler Enzyme bleibt jedoch im wesentlichen auf die Anwendung von Gefrierschnitten begrenzt. Hierbei wird das exzidierte Gewebe bei tiefen Temperaturen und ohne zusätzliche Einbettmittel geschnitten. Durch das Einfrieren werden die Zellenzyme nicht tangiert und können im Schnitt dargestellt werden (2, 32, 39). Der Kryostatschnitt bietet jedoch bezüglich der Zelldifferenzierung aufgrund der Zellmorphologie naturgemäß nicht die Qualität, die ein Paraffinschnitt erreicht. Auf der anderen Seite ist die direkte Enzymdarstellung im Paraffin- oder Semidünnschnitt bis auf einige Ausnahmen nicht möglich. Die Enzymaktivität übersteht den Prozeß der Einbettung nicht (42).

Seit der Entwicklung des Konzepts der lysosomalen Enzyme (1, 18, 44) wurden verstärkt morphologische Studien zur Erforschung intrazellulärer Lokalisation saurer Phosphatase unternommen (40). Die Azokupplungsmethode (4) wird hauptsächlich an Gefrierschnitten angewandt. Die Bleiphosphatmethode (22) findet überwiegend in der Transmissionselektronenmikroskopie ihre Anwendung (19).

Vereinzelte wird auch über Versuche der Enzymdarstellung in Geweben, die in Paraffin oder Methacrylat eingebettet wurden, berichtet (25). An lymphatischen Geweben wurde in Lymphozytensubpopulationen nach Einbettung in Glycol-Methacrylat saure Esterase in schwacher Aktivität nachgewiesen (11,26). Die Polymerisation von Glycol-Methacrylat, bei tiefen Temperaturen durchgeführt, scheint die Enzymaktivität noch einem späteren Nachweis - bei entsprechend längerer Inkubation der Schnitte - zugänglich zu machen (12, 44).

Die von uns entwickelte Methode hat zum Ziel, den Nachteil der Enzymnachweisverfahren am Kryostatschnitt - nämlich die schlechte Morphologie - zu umgehen.

Mit der Inkubation der Gewebescheiben im Enzymnachweismedium unter Überdruck, wie in Kap. 2 beschrieben, können wir anschließend eine Einbettung in Paraffin oder Methacrylat wählen. Das Enzymmuster ist schon vor der Fixierung im gesamten "Volumen" der Gewebescheibe farblich dargestellt. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen können dann je nach dem an Paraffin- oder Semidünnschnitten vorgenommen werden. Trotz der Enzymdarstellung müssen keine Abstriche bezüglich der Morphologie der Schnitte in Kauf genommen werden. Die besten Ergebnisse konnten wir bei der Darstellung der sauren Phosphatase in Semidünnschnitten erzielen (Abb. 3c). Dieses Enzym markiert in einem diffusen intrazytoplasmatischen Reaktionsmuster die Zellen der histiozytoiden Reihe. In lymphoiden Zellen findet sich eine fleckförmige paranukleäre Positivität besonders in T-Helfer-Zellen. Der Darstellung dieses Enzyms kommt bei der Diagnostik von malignen Lymphomen und der Differenzierung von histiozytären Proliferationen

besondere Bedeutung zu. Auch weitere Enzyme wie die alkalische Phosphatase und die β -Glucuronidase können mit unserer Methode dargestellt werden. Der Nachweis saurer Esterase bedarf noch methodischer Verbesserungen.

Bei der Wahl zwischen einem Semidünnschnitt und einem Paraffinschnitt wird man sich wegen der besseren Morphologie für einen Semidünnschnitt entscheiden (Abb. 3b und 3c). Der Wert der Einbettung in Paraffin liegt aber insbesondere in der routinemäßigen Durchführbarkeit, während das Semidünnschnittverfahren zeitlich und technisch aufwendiger ist. Wie schon mehrfach herausgestellt wurde, werden mit unserer Methode die Enzyme nach der Exzision in Gewebescheiben unmittelbar dargestellt.

Bei der nachfolgenden Fixierung und dem Einbetten in Paraffin oder Methacrylat muß nur gewährleistet sein, daß der an den Stellen der Enzymaktivität liegende Farbstoff nicht herausgewaschen wird. Dies kann am einfachsten an einem Kryostatschnitt aus einer schon inkubierten und gefärbten aber noch nicht fixierten Scheibe kontrolliert werden. Da die Inkubation in einem Enzymnachweismedium an mehreren Gewebescheiben aus der gleichen Exzision durchgeführt wird, kann auch die Inkubation selbst bezüglich der Zeit, der Temperatur und des Druckes mit einem solchen "Schnellschnitt" gesteuert werden.

4.3 Kombiniertes Verfahren: Enzymzytochemie mit Autoradiografie

Eine weitere Ergänzung der Möglichkeit der Zelldifferenzierung ergibt sich durch simultane Kombination der Enzymdarstellung in Semidünnschnitten mit der *in vitro* Autoradiografie. Diese Verbindung

ist erstmals durch Anwendung unserer Methode der Enzymdarstellung gelungen. Die Zelldifferenzierung kann aufgrund der Enzymausstattung der Zelle, aufgrund der Zellkernaktivität und aufgrund der sehr guten Morphologie eines Semidünnschnittes gleichzeitig vorgenommen werden.

Durch Versuche mit und ohne Autoradiografie und mit und ohne Enzymdarstellung kann eine gegenseitige Beeinflussung während der Inkubation ausgeschlossen werden.

Der Einfluß des Farbstoffes auf die Fotoemulsion konnte mit Hilfe einer Trennschicht (Kap. 2.3.6) beseitigt werden. Eine Einbettung in Paraffin ist bei diesem kombinierten Verfahren auch möglich, erscheint uns jedoch wegen des hohen Aufwandes für die Autoradiografie und aus methodischen Gründen nicht vorteilhaft.

4.4 Lymphomatoide Papulose

Seit der Erstbeschreibung dieses Krankheitsbildes durch Dupont (16) im Jahre 1965 wurden ca. 200 Krankheitsfälle publiziert. Der Name 'lymphomatoide Papulose' wurde erst später von Maculay geprägt (34).

Klinisch handelt es sich um locker disseminierte Hautveränderungen, die am gesamten Integument lokalisiert sein können. Die Schleimhäute werden nur selten befallen. Die typische Effloreszenz wird als glatte, braun-rote glänzende, bis zu 2 cm große Papel mit weicher Konsistenz, im weiteren Verlauf eine Schuppe bildend oder zentral ulzerierend, angegeben. Zahlreiche Variationen dieser Grundeffloreszenz wurden beschrieben (15, 35, 36, 37). In vielen Fällen liegt die Zahl der Eruptionen, die gleichzeitig vorkommen, zwischen 10 und 20. Von der Entstehung

einer typischen Eruption bis zur makulären Abheilung vergehen in der Regel vier bis acht Wochen. Die Erkrankung zeigt Perioden mit Exacerbation, denen regelmäßig und spontan beschwerdefreie Intervalle folgen.

Die Erkrankungsdauer ist sehr unterschiedlich und wird im Durchschnitt mit 9 Jahren bei Frauen und 6,5 Jahren bei Männern angegeben (6, 15, 41).

Alle fünf von uns untersuchten Patienten waren Männer im Alter von 22 bis 78 Jahren. Der in Abb. 5 gezeigte Schnitt stammt von einem 78-jährigen Patienten, der seit über 40 Jahren an einer lymphomatoiden Papulose leidet. Eine wesentliche Besserung seiner Erkrankung empfindet er seit der Anwendung einer Photochemotherapie (PUVA) vor fünf Jahren.

Die Hautexzision wurde aus einer frischen Papel am linken Unterarm entnommen.

Dieser über Jahre bis Jahrzehnte sich wiederholende, insgesamt jedoch gutartige Verlauf ordnet die lymphomatoide Papulose zu dem von Maculay geprägten Oberbegriff "rhythmic paradoxical eruption" (35) und steht im Gegensatz zu dem histologisch maligne erscheinenden Infiltratbild. Ein Übergang in ein malignes Lymphom kommt nur in etwa 4 % der Fälle vor (5, 17, 28).

Das histologische Bild erinnert an ein malignes Lymphom. Spongiose und Exozytose in der Epidermis wird häufig von Ulzerationen begleitet. Im Korium findet sich ein lymphohistiozytäres Infiltrat mit Exozytose in die Epidermis, daneben Ödem im Stratum papillare, Weitstellung der Gefäße, Endothelschwellung und Erythrozytenextravasation

sowie einzelne neutrophile Granulozyten. Besonders in fortgeschrittenen Krankheitsstadien finden sich krankheitstypische große Blasten mit atypischen großen Kernen, dichtem Chromatin und ausladendem eosinophilen Zytoplasma und Mitosen (7, 46).

In frühen Stadien der Erkrankung kann eine Abgrenzung der lymphomatoiden Papulose von der *Pytiriasis lichenoides acuta et varioliformis* (Mucha-Habermann) klinisch und histologisch schwierig sein. In den voll ausgebildeten Krankheitsstadien ist histologisch ein malignes Lymphom abzutrennen. Die Natur der blastenartigen Zellelemente ist strittig. Neben einer lymphozytären kommt auch eine histiozytäre Herkunft in Betracht.

Unsere Untersuchungen am Methacrylat eingebetteten Semidünnschnitt mit saurer Phosphatase (Abb. 5) lassen erkennen, daß es sich bei diesen atypischen Zellelementen aufgrund der negativen Enzymreaktionen am ehesten um Zellen der lymphozytären Reihe handelt. Wenngleich nur wenige (fünf) Fälle mit lymphomatoider Papulose zur Untersuchung kommen konnten, so läßt sich dennoch an diesem Beispiel darstellen, wie eine Verbesserung der Interpretation der Infiltratzellen durch die neue Technik möglich ist.

Es ist zu erwarten, daß die Anwendung dieser Methode besonders bei den Erkrankungen einen wesentlichen Fortschritt der Zellinterpretation bringt, bei denen erst die kombinierte Darstellung von Zellmorphologie in situ im Gewebe mit der Phänotypisierung aufgrund des Enzymmusters und der Darstellung der Proliferationskinetik neue Möglichkeiten der Interpretation eröffnen, so z.B. besonders bei der pagetoiden Retikuloze, bei den großzelligen ("histiozytoiden") Lym-

phomen, beim Morbus Hodgkin und möglicherweise auch bei der Frühdiagnose maligner Lymphome wie z.B. der Mycosis fungoides.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit histochemischen Methoden können Zellen in Gewebeschnitten aufgrund ihres Enzymmusters differenziert werden. Von wenigen Ausnahmen abgesehen kann dieses Enzymmuster nur in Kryostatschnitten dargestellt werden. Der Nachteil dieser Schnitte besteht in der schlechten morphologischen Qualität zytologischer Strukturen. Die neu entwickelte Methode der en bloc-Inkubation beseitigt diesen Nachteil, indem sie es ermöglicht, verschiedene lysosomale Enzyme in Paraffin- und in Methacrylat eingebetteten Semidünnschnitten darzustellen. Sehr gute Ergebnisse konnten bei der Darstellung der sauren Phosphatase erzielt werden, insbesondere im Hinblick auf die Bedeutung in der Diagnostik von malignen Lymphomen.

Eine weitere Möglichkeit der Zelldifferenzierung - eine simultane Kombination der Enzymdarstellung mit der in vitro Autoradiografie in Semidünnschnitten - wird erstmals in dieser Arbeit aufgezeigt. Die Phänotypisierung der Zelle kann in einem Schnittpräparat aufgrund der Enzymausstattung, der Proliferationskinetik des Zellkernes und der sehr guten Morphologie eines Semidünnschnittes gleichzeitig vorgenommen werden.

Diese Techniken wurden auch bei dermalen Infiltraten der lymphomatoiden Papulose angewandt. Die im Semidünnschnitt deutlich erkennbaren krankheitstypischen Blasten mit großen Kernen sind zum Teil, entsprechend der Proliferationskinetik, mit Tritiumthymidin markiert, jedoch bezüglich saurer Phosphatase immer negativ. Aufgrund dieser Befunde lassen sich die atypischen Zellen bei der lymphomatoiden Papulose am ehesten den Zellen der lymphozytären Reihe zuordnen.

Die Anwendung der Enzymdarstellung mit der Autoradiografie in Semi-dünnschnitten eröffnet neue Wege der Diagnostik von Hautlymphomen, insbesondere der pagetoiden RetikULOse, großZelliger "histiozytoider" Lymphome, des Morbus Hodgkin und bei der Frühdiagnose der Mycosis fungoides.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) F Appelmans, R Wattiaux, CDE Duve (1955)
Tissue fractionation studies: The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in the liver.
Biochem J 59: 438-445
- 2) M Arnold (1968)
Histochemie.
Springer, Berlin Heidelberg New York
- 3) AE Ashford, WG Allaway, ME McCully (1972)
Low temperature embedding in glycol methacrylate for enzyme histochemistry in plant and animal tissues.
J Histochem Cytochem 12: 986-990
- 4) T Barka, PJ Anderson (1963)
Histochemistry. Theory, practice and bibliography.
Hoeber, New York Evanston London
- 5) MM Black, E Wilson-Jones (1972)
Lymphomatoid pityriasis lichenoides, a variant with histological features simulating a lymphoma.
Br J Dermatol 86: 329-347
- 6) O Braun-Falco, J Nikolowski, G Burg, C Schmoeckel (1983)
Lymphomatoide Papulose.
Hautarzt 34: 59-65
- 7) G Burg, G Hoffman-Fezer, J Nikolowski, C Schmoeckel, O Braun-Falco, K Stünkel (1981)
Lymphomatoid papulosis - a cutaneous T cell pseudolymphoma.
Acta Derm Venereol, Stockh, 61: 491-496
- 8) G Burg (1980)
Enzymzytochemische und immunologische Methoden bei Pseudolymphomen und kutanen Lymphomen.
Z Hautkr 55: 1351-1366

- 9) G Burg, O Braun-Falco (1978)
Cutaneous non-Hodgkin lymphoma: reevaluation of histology using
enzyme cytochemical and immunologic studies.
Int J Dermatol 17: 496-505
- 10) G Burg, O Braun-Falco (1983)
Cutaneous Lymphomas, Pseudolymphomas, and Related Disorders.
Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
- 11) VL Burgio, U Magrini, E Ascari (1980)
Identification of human lymphocyte subpopulations by acid
naphthylacetate esterase activity on glycol-methacrylate embedded
biopsies.
Haematologica 65: 725-736
- 12) VL Burgio, E Morra, E Ascari (1982)
Histochemistry on glycol-methacrylate embedded human bone marrow
biopsies.
Haematologica 67: 177-187
- 13) R Burkhardt (1966)
Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des mensch-
lichen Knochenmarkes.
Blut 14: 30-37
- 14) MS Burstone (1962)
Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms.
Academic Press, New York
- 15) MS Doutre, P Bioulac, AM Kern, A Broustet, C Beylot (1977)
La Papulose lymphatoïde. Étude ultrastructurale.
Sem Hôp, Paris, 53: 1351-1358
- 16) A Dupont (1965)
Langsam verlaufende und klinisch gutartige Reticulopathie mit
höchst maligner histologischer Struktur.
Hautarzt 16: 284-286

- 17) A Dupont (1973)
Transformation maligne très tardive d'une réticulose papuleuse
à évolution prolongée (Lymphatoid papulosis).
Ann Dermatol Syphiligr 100: 141-146
- 18) CDE Duve (1959)
Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. In: Subcellular
particles. R Hayashi (ed.)
Ronald Press, New York
- 19) JLE Ericsson, BF Trump (1965)
Observations on the application to electron microscopy of the
lead phosphate technique for the demonstration of acid phosphatase.
Histochemie 4: 470-487
- 20) R Fischer, P Lorbacher, C Käufer (1964)
Untersuchungen zur Enzymhistochemischen Differenzierung von leukä-
mischen Erkrankungen am Schnittpräparat.
Virchows Arch path Anat 337: 525-538
- 21) G Gomori (1941)
Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal
and under pathologic conditions.
Arch path 32: 189-199
- 22) M Hayashi, Y Nakajima, WH Fishman (1963)
The cytologic demonstration of β -glucuronidase.
J Histochem Cytochem 12: 293-297
- 23) JA Heddle, S Wolff, D Whissel, JE Cleaver (1967)
Autoradiography.
Science 158: 18-35
- 24) HH Hennekeuser (1872)
Histochemischer Nachweis von Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase
an Methacrylatschnitten.
Klin Wschr 50: 213-214

- 25) S Higuchi, M Suga, AM Dannenberg, H Brian (1979)
Histochemical demonstration of enzyme activities in plastic
and paraffin embedded tissue sections.
Stain Technology 54: 5-12
- 26) M Hoshimo, H Kobayashi (1971)
The use of glycol methacrylat as an embedded medium for the
histochemical demonstration of acid phosphatase activity.
J Histochem Cytochem 19: 575-577
- 27) A Hovmark (1977)
Acid naphtylacetat esterase staining of T-lymphocytes in
human skin.
Acta Dermatol Venereol, Stockh, 57: 497-502
- 28) A Kawada, K Anekoji, M Miyamoto, T Nakaji, S Mori (1969)
Unusual manifestation of malignant reticulosis of the skin:
cutaneous lesion simulating parapsoriasis guttata.
Dermatologica 138: 369-378
- 29) J Kummermehr, G Burg (1982)
Autoradiographic pattern of cell proliferation by cutaneous
malignant lymphoma. In: Lymphoproliferative disease of the skin.
M Goos, E Christophers (eds)
Springer, Berlin Heidelberg New York
- 30) LD Leder (1964)
Über die selektive fermentzytochemische Darstellung von neutrophilen
myeloischen Zellen und Gewebsmastzellen im Paraffinschnitt.
Klin Wschr 42: 553-574
- 31) LD Leder (1967)
Der Blutmonocyt.
Springer, Berlin Heidelberg New York
- 32) Z Lojda, R Grossrau, TH Schieler (1976)
Enzymhistochemische Methoden.
Springer, Berlin Heidelberg New York

- 33) P Lorbacher (1967)
Zur Anwendung enzymhistochemischer Methoden an bioptisch gewonnenem Knochenmarkgewebe.
Blut 15: 19-28
- 34) WL Macaulay (1968)
Lymphatoid papulosis. A continuing self-healing eruption, clinically benign - histologically malignant.
Arch Dermatol 97: 23-30
- 35) WL Macaulay (1978)
Lymphomatoid papulosis.
Int J Dermatol 17: 204-212
- 36) W Maciejewski, HJ Bandmann (1979)
Lymphomatoide Papulose. Ein Beitrag zu "Rhythmic Paradoxial Eruptions".
Z Hautkr 54: 973-977
- 37) BC Macmillan, HR Vickers (1971)
Lymphatoid papulosis.
Br J Dermatol 85: 294-295
- 38) WC Moloney, K McPherson, L Fliegelman (1960)
Esterase activity in leukocytes demonstrated by the naphtol AS-D chloracetat substrate.
J Histochem Cytochem 8: 200-218
- 39) AGE Pearse (1980)
Histochemistry.
Churchil Livingstone 4. ed
- 40) D Sabatini, K Bensch, RJ Barnett (1963)
Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation.
J Cell Biol 17: 19-58

- 41) B Sina, W Burnett (1983)
Lymphomatoid papulosis.
Arch Dermatol 119: 189-197
- 42) L Spannhof (1967)
Einführung in die Praxis der Histochemie.
Gustav Fischer, Jena
- 43) W Sterry, GK Steigleder (1981)
Enzym polymorphism of dermal lymphocytes in mycosis fungoides.
Arch Dermatol Res 27: 185-187
- 44) R Wattiaux, CDE Duve (1956)
Ti-sue fractionation studies.
Biochem J 63: 606-608
- 45) H Westen, KF Mück, L Post (1981)
Enzyme histochemistry on bone marrow sections after embedding
in methacrylate at low temperature.
Histochemistry 70: 95-105
- 46) R Willemze, CJLM Meyer, WA van Vloten, E Schefer (1982)
The clinical and histological spectrum of lymphatoid papulosis.
Br J Dermatol 107: 131-134

Herrn Prof.Dr.Dr.h.c. O. Braun-Falco danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr. Burg für die Auswahl des Themas sowie für die unermüdliche und optimistische Unterstützung.

Ganz herzlich danke ich Frau Ebmeyer für die Zubereitung der verschiedenen Färbelösungen aus ihrer "Rezepteküche".

Last but not least möchte ich mich bei Frau Pfab, Frau Pfeifer und Frau Raith für ihre technische Hilfe bedanken.

